

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JC675 U.S. PTO

09/441055



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年11月17日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第326717号

出 願 人

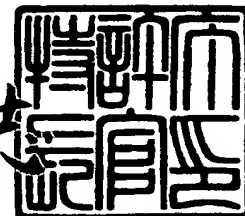
Applicant (s):

味の素株式会社

1999年 6月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

佐山 建志



出証番号 出証特平11-3037804

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-6041

【提出日】 平成10年11月17日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/06

【発明の名称】 発酵法による L-メチオニンの製造法

【請求項の数】 11

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社発酵  
技術研究所内

【氏名】 臼田 佳弘

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社発酵  
技術研究所内

【氏名】 倉橋 修

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 発酵法による L-メチオニンの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

【請求項 2】 細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

【請求項 3】 L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

【請求項 4】 さらに細胞内の S-アデノシルメチオニンシンテース活性が弱化した請求項 1～3 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 5】 ホモセリントランスサクシニラーゼ活性の増強が、前記微生物細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は同遺伝子の発現調節配列を増強することによるものである請求項 2～4 記載の微生物。

【請求項 6】 L-メチオニンと S-アデノシルメチオニンによる協奏阻害が解除されたホモセリントランスサクシニラーゼを保持する請求項 1 又は 4 に記載の微生物。

【請求項 7】 L-スレオニン要求性を示すことを特徴とする請求項 1～6 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 8】 細胞内のシスタチオニナーシンテース活性及びアスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼ II 活性が増強された請求項 1～7 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 9】 エシェリヒア属に属することを特徴とする請求項 1～8 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 10】 請求項 1～9 のいずれか一項に記載の微生物を培地に培養し、培地中に L-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とする L-メチオニンの製造法。

【請求項 11】 配列番号 26 に示すアミノ酸配列において、27位のアルギニンがシステインに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、298位のプロリンがロイシンに置換する変異、27位のアルギニンがシステインに置換しかつ296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換しかつ298位のプロリンがロイシンに置換する変異、298位のプロリンがロイシンに置換しかつ27位のアルギニンがシステインに置換する変異、又は、27位のアルギニンがシステインに置換し、296位のイソロイシンがセリンに置換しかつ298位のプロリンがロイシンに置換する変異のいずれかに相当する変異を有するアミノ酸配列を有し、L-メチオニンとS-アデノシルメチオニンによる協奏阻害が解除されたホモセリントランスサクシニラーゼをコードするDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、発酵法によるL-メチオニンの製造法に関する。L-メチオニンは、医薬等として重要なアミノ酸である。

【0002】

【従来の技術】

メチオニンは、工業的には化学合成により製造されるDL体が中心となっている。L体が必要な場合は、このDL体をアセチル化してN-アセチル-DL-メチオニンとし、酵素的にL体だけを脱アセチル化することによって製造される。

【0003】

一方、発酵法によるL-メチオニンの製造については、メチオニンアナログ耐性変異株を用いる方法が報告されているが、生産量は少なく、またL-メチオニン生産に影響を与える因子は明らかではないため、最も発酵生産が困難なアミノ酸の一つである。例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli* (*E. coli*)) K-12株を用いる方法が、公開特許公報昭56-35992あるいは文献 (Chattapadhyay, M. K. et al., *Med. Sci. Res.* 23, 775 (1995)、Chattapadhyay, M. K. et al., *Biotechnol. Lett.* 17, 567-570 (1995)) に報告されているが、

いずれも L-メチオニンの生産量は工業的に用いるには不十分であった。

【0004】

*E. coli*においては、L-メチオニンの生合成経路は、L-スレオニンの生合成経路と一部共通であり、L-ホモセリンが共通の中間体となっている。L-ホモセリンから L-メチオニンへの固有経路の第一段階は、ホモセリントランスサクシニラーゼ (HTS) によって触媒されるが、同酵素は最終生産物である L-メチオニンと L-メチオニンの代謝物である S-アデノシルメチオニンにより協奏的な阻害を受けることが知られている (Lee, L.-W. et al., *J. Biol. Chem.* 241, 5479-5480 (1966))。

【0005】

*E. coli*のホモセリントランスサクシニラーゼをコードする遺伝子である *metA* 配列は、ダクロスらにより報告されており (Duclos, B. et al., *Nucleic Acids Res.* 17, 2856 (1989))、*metA*の変異株の取得についても、L-メチオニンのアナログである  $\alpha$ -メチル-D L-メチオニン (MM) に対する耐性を利用した方法が知られている (Chattopadhyay, M. K. et al., *J. Gen. Microbiol.* 137, 685-691 (1991))。しかし、MM耐性株の *metA* 遺伝子産物であるホモセリントランスサクシニラーゼが、L-メチオニンと S-アデノシルメチオニン (SAM) による阻害解除型となるという報告は、サルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) においてなされているが (Lawrence, D. A. et al., *J. Bacteriol.* 109, 8-11 (1972))、変異型 *metA* 遺伝子の塩基配列の報告はない。さらに、*metA*の単独変異株は、L-メチオニンを排出しないと報告されている (Chattopadhyay, M. K. et al., *J. Gen. Microbiol.* 137, 685-691 (1991))。

【0006】

*metA*を含めて、ホモセリントランスサクシニラーゼによる反応以降の L-メチオニンの固有生合成経路の酵素遺伝子の発現は、*metJ* 遺伝子産物であるリプレッサーによる抑制を受けることも明らかとなっている (Greene, R. C., *Biosynthesis of Methionine. in "Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition"*, ed. Neidhardt, F. D., ASM Press, pp. 542-560 (1996).)。 *metJ* 遺伝子は、L-メチオニンへの固有生合成経路の第二の酵

素シスタチオニン $\gamma$ -シンテースをコードするmetB遺伝子と、アスパルトキナーゼーホモセリンデヒドロゲナーゼII (AK-HDII) をコードするmetLとからなるmetBLオペロンと、逆向きに隣接していることが知られている (Duchange, N. et al., J. Biol. Chem. 258, 14868-14871 (1983))。

【0007】

L-メチオニンからS-アデノシルメチオニンへの代謝反応を触媒するS-アデノシルメチオニン合成酵素をコードするmetKは、必須遺伝子であることが示唆されている (Greene, R. C., Biosynthesis of Methionine. in "Escherichai coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition", ed. N eidhardt, F. D., ASM Press, pp. 542-560 (1996))。また、metKの変異株は、DL-ノルロイシンやエチオニンなどのメチオニンアナログ耐性により得られることが知られているとともに (Chattopadhyay, M. K. et al., J. Gen. Microbiol. 137, 685-691 (1991))、L-メチオニンへの固有生合成経路の酵素の発現を上昇させることがと報告されている (Greene, R. C. et al., J. Bacteriol. 115, 57-67 (1973))。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、L-メチオニン生合成に関与する酵素やその遺伝子について、ある程度の報告はあるが、L-メチオニンの発酵生産に直接結びつく知見はほとんど得られておらず、L-メチオニン生産菌育種への応用もほとんどなされていない。

【0009】

本発明は、上記現状に鑑みなされたものであり、L-メチオニン生産に影響を与える因子を明らかにしてL-メチオニン生産菌を育種し、発酵法によるL-メチオニンの生産を可能とすることを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。



すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0011】

(1) L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

(2) 細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

(3) L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

【0012】

(4) さらに細胞内のS-アデノシルメチオニンシンテース活性が弱化した前記(1)～(3)のいずれかの微生物。

(5) ホモセリントランスサクシニラーゼ活性の増強が、前記微生物細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は同遺伝子の発現調節配列を増強することによるものである(2)～(4)の微生物。

(6) L-メチオニンとS-アデノシルメチオニンによる協奏阻害が解除されたホモセリントランスサクシニラーゼを保持する(1)又は(4)に記載の微生物。

(7) L-スレオニン要求性を示すことを特徴とする(1)～(6)のいずれかの微生物。

(8) 細胞内のシスタチオニナーシンテース活性及びアスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼII活性が増強された(1)～(7)のいずれかの微生物。

(9) エシェリヒア属に属することを特徴とする(1)～(8)のいずれかの微生物。

【0013】

(10) 前記(1)～(9)のいずれかの微生物を培地に培養し、培地中にL-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするL

ーメチオニンの製造法。

【0014】

(11) 配列番号26に示すアミノ酸配列において、27位のアルギニンがシステインに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、298位のプロリンがロイシンに置換する変異、27位のアルギニンがシステインに置換しかつ296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換しかつ298位のプロリンがロイシンに置換する変異、298位のプロリンがロイシンに置換しかつ27位のアルギニンがシステインに置換する変異、又は、27位のアルギニンがシステインに置換し、296位のイソロイシンがセリンに置換しかつ298位のプロリンがロイシンに置換する変異のいずれかに相当する変異を有するアミノ酸配列を有し、L-メチオニンとS-アデノシルメチオニンによる協奏阻害が解除されたホモセリントランスサクシニラーゼをコードするDNA。

【0015】

本明細書において、S-アデノシルメチオニンを「SAM」、 $\alpha$ -メチル-DL-メチオニンを「MM」、DL-ノルロイシンを「NL」と呼ぶことがある。また、S-アデノシルメチオニンシンテースを「SAM合成酵素」、ホモセリントランスサクシニラーゼを「HTS」ということがある。また、E. coliのmetB遺伝子産物シスタチオニン $\gamma$ -シンテースを「シスタチオニン合成酵素」、metL遺伝子産物「アスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼII」をAK-HDIIと呼ぶことがある。

【0016】

本発明において「L-メチオニン生産能」とは、本発明の微生物を培地に培養したときに、培地中にL-メチオニンを蓄積する能力をいう。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の微生物は、L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物、又は、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物である

。本発明の微生物は、L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強されていることが好ましい。

さらに、本発明の微生物は、細胞中のSAM合成酵素活性が弱化していることが好ましい。

【0018】

上記のような微生物としては、L-ホモセリンからアシル転移反応により生じるO-アシルホモセリンを経てL-メチオニン及びSAMを産生する経路を有し、該アシル転移酵素の発現がリプレッサーによる抑制によって制御されるものであれば、特に制限されない。そのような微生物としては、エシェリヒア属細菌、コリネ型細菌、バチルス属細菌等の細菌が挙げられるが、エシェリヒア属細菌、例えばE. coliが好ましい。

【0019】

また、本発明の微生物は、E. coliのように、それが保持するHTSがL-メチオニン及びSAMによる協奏阻害を受けるものであれば、その阻害を解除することによって、L-メチオニン生産能を向上させることができる。

【0020】

メチオニン生合成の固有経路は、E. coli等多くの微生物のようにシスタチニオンを経由するものと、ブレバクテリウム・フラバムのようにシスタチオニンを経由しないものがある(Ozaki, H. et al., J. Biochem., 91, 1163, (1982))が、本発明においては、シスタチニオンを経由する経路を有するものが好ましい。そのような微生物においては、細胞内のシスタチオニン合成酵素活性を増強することにより、L-メチオニン合成能を強化することができる。なお、ブレバクテリウム・フラバムのような微生物であっても、L-メチオニン生合成系のリプレッサーの欠損又は/及びHTSの増強によって、L-メチオニン生産能を高めることができる。

【0021】

さらに、上記微生物において、L-メチオニン生合成及びL-スレオニン生合成の共通経路に関与するアスパルトキナーゼ活性又はホモセリンデヒドロゲナー

ぜ活性の少なくとも一方を増強することによって、一層L-メチオニン生産能を高めることができる。

【0022】

上記の各特性の2以上を微生物に付与する場合、その順序は特に制限されず、任意の順序で付与することができる。また、複数の遺伝子を微生物に導入する場合、それらの遺伝子は同じベクターに搭載してもよく、複数の異なるベクターに別個に搭載してもよい。尚、複数のベクターを用いる場合は、異なる薬剤マーカ-、及び異なる複製起点を有するベクターを用いることが好ましい。

以下に、上記の各特性を微生物に付与する方法を説明する。

【0023】

<1> L-メチオニン生合成系のリプレッサーの欠損

微生物のL-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損させるには、微生物に変異処理を施し、同リプレッサーを産生しなくなった株を選択することにより、行うことができる。変異処理は、微生物の変異株の取得に通常用いられている方法、例えば紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の突然変異に用いられている変異剤により行うことができる。

【0024】

また、微生物の染色体DNA上の前記リプレッサーをコードする遺伝子を破壊することによっても、同リプレッサーを欠損させることができる。遺伝子の破壊は、コード領域又は発現調節配列の少なくとも一部を欠失した欠失型遺伝子を作製し、該欠失型遺伝子と染色体上の遺伝子との相同組換えを起こさせ、染色体上の遺伝子を欠失型遺伝子で置換することによって行うことができる(遺伝子置換)。

【0025】

リプレッサー遺伝子は、例えば、E. coliのL-メチオニン生合成系のリプレッサーをコードする遺伝子(metJ)の塩基配列は知られているので(Duchange, N. et al., J. Biol. Chem. 258, 14868-14871 (1983))、該塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いたPCRにより、染色体DNAから単離することが

できる。こうして得られる遺伝子断片から一定の領域を制限酵素により切り出し、コード領域又は発現調節領域の少なくとも一部を欠失させることによって、欠失型遺伝子を作製することができる。

【0026】

遺伝子置換は、例えば次のようにして行うことができる。温度感受性複製起点を有するベクターに欠失型遺伝子を搭載させて組換えベクターを調製し、同組換えベクターで微生物を形質転換し、欠失型遺伝子と染色体DNA上の遺伝子との相同組換えにより染色体DNA上の遺伝子に欠失型遺伝子を挿入させる。その後、形質転換株を前記ベクターが複製できない温度で培養し、細胞質中のベクターを脱落させる。さらに、染色体上の1コピーの遺伝子をベクターとともに脱落させることにより、遺伝子が置換される。目的の遺伝子置換が生じていることは、遺伝子置換株の染色体DNAをサザン・ハイブリダイゼーションにより解析することにより、確認することができる。

【0027】

E. coli用の温度感受性複製起点を有するベクターとしては、例えば特願平9-194603号に記載のプラスミドpMAN997等が、また、コリネ型細菌用の温度感受性複製起点を有するベクターとしては、例えば特開平5-7491号公報に記載のプラスミドpHSC4等が挙げられるが、これらに限定されず、他のベクターを用いることもできる。

【0028】

前述したようにE. coliでは、metJ遺伝子は、metB遺伝子とmetL遺伝子とからなるmetBLオペロンと、逆向きに隣接していることが知られている（Duchange, N. et al., J. Biol. Chem. 258, 14868-14871 (1983)）。したがって、欠失型metJ遺伝子に、適当なプロモーター配列を連結し、上記と同様に遺伝子置換を行うことによって、metJ遺伝子の破壊と、metBLオペロンのプロモーター置換による発現改善とを、一度の相同組換えによって行うことができる。metBLオペロンの発現が向上すると、細胞内のシスタチオニン合成酵素活性及びAK-HDII活性が増強される。

【0029】

具体的には、E. coli、例えばW3110株染色体DNAを鋳型とし、配列番号5及び配列番号6記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR反応 (polymerase chain reaction; White, T.J. et al; Trends Genet., 5, 185 (1989)) により得られるmetB遺伝子を含む約1 kbの断片と、配列番号7及び配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR反応により得られるmetJ遺伝子の下流部分を含む約1 kbの断片と、配列番号9及び配列番号10に示すオリゴヌクレオチドをアニールして得られるスレオニンオペロンのプロモーター配列を有する配列の三者を、適当なベクターに挿入して連結することによって、metJの構造遺伝子が欠失し、metBLオペロンのプロモーターがスレオニンプロモーターに置換した構造を有するDNA断片を含む組換えベクターを得ることができる。

## 【0030】

上記のようにして調製した組換えベクターを微生物に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K-12 について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. et al., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法 (Duncan, C. H. et al., Gene, 1, 153 (1977)) がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Chang, S. et al., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J. et al., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978)) も応用できる。また、コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照) によって行うことができる。

## 【0031】

metJ、metBL、あるいは後述のmetA、metK及びthrBC等の各遺伝子のクローニング等に用いるベクターとしては、例えばE. coli細胞内で自律複製可能なプラス

ミド、具体的にはpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。また、ファージベクターを用いてもよい。E. coli以外の微生物を用いる場合は、同微生物及びE. coliにおいて自律複製可能なシャトルベクターを用いることが好ましい。例えば、コリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドとしては、以下のものが挙げられる。

【0032】

p AM	330	特開昭58-67699号公報参照
p HM	1519	特開昭58-77895号公報参照
p AJ	655	特開昭58-192900号公報参照
p AJ	611	同 上
p AJ	1844	同 上
p CG	1	特開昭57-134500号公報参照
p CG	2	特開昭58-35197号公報参照
p CG	4	特開昭57-183799号公報参照
p CG	11	同 上
p HK4		特開平5-7491号公報参照

【0033】

遺伝子断片とベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である

その他、染色体DNAの調製、染色体DNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載されている。

【0034】

<2>HTS活性の増強、及び変異型HTSの付与

微生物細胞内のHTS活性は、前記微生物細胞内のHTSをコードする遺伝子

断片を、同微生物で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これを前記微生物に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のHTSをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、HTS活性が増強される。E. coliでは、HTSはmetA遺伝子にコードされている。微生物としてエシェリヒア属細菌を用いる場合、導入するHTS遺伝子は、エシェリヒア属細菌由来の遺伝子を用いることが好ましいが、ホモセリントランスアセチラーゼを有するコリネ型細菌等の他の微生物由来の遺伝子を使用することもできる。

## 【0035】

HTS活性の増強は、HTS遺伝子を微生物宿主の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。コリネバクテリウム属細菌に属する微生物の染色体DNA上にHTS遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、HTS遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のHTS遺伝子のコピー数が上昇する結果、HTS活性が増強される。

## 【0036】

HTS活性の増強は、上記の遺伝子増強による以外に、HTS遺伝子の発現調節配列を増強することによっても達成される。具体的には、染色体DNA上又はプラスミド上のHTS遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換する（特開平1-215280号公報参照）。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのP<sub>R</sub>プロモーター、P<sub>L</sub>プロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、HTS遺伝子の発現が強化されることによってHTS活性が増強される。

## 【0037】



*E. coli*のHTS遺伝子 (*metA*) は、その塩基配列が知られているので (Blattner, F. R. et al., *Science*, 277, 1453-1462 (1997))、該塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いたPCRにより、染色体DNAから単離することができる。そのようなプライマーとして具体的には、配列番号21及び配列番号22に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0038】

上記のようにして微生物細胞内のHTS活性を増強することによって、L-メチオニン生合成が強化され、L-メチオニンの生成量を増加させることができると考えられる。

【0039】

また、HTSは、L-メチオニンとSAMによる協奏的阻害を受けるので、この協奏阻害が解除されたHTSを微生物に保持させることによって、L-メチオニン生合成系を強化することができる。前記協奏阻害が解除されたHTSを微生物に保持させることは、微生物に変異処理を施し、同協奏阻害が解除されたHTSを産生する株を選択することにより、行うことができる。変異処理は、微生物の変異株の取得に通常用いられている方法、例えば紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の突然変異に用いられている変異剤により行うことができる。ここで、「L-メチオニンとSAMによる協奏阻害を解除されたHTS」とは、L-メチオニン及びSAMの非存在下における酵素活性に対するL-メチオニンもしくはSAM、又はL-メチオニン及びSAMの存在下での酵素活性の比 (残存率) が、野生型HTSのそれよりも高いHTSをいう。具体的には、例えば、1 mMのL-メチオニン存在下での残存率が40%以上、好ましくは80%以上、1 mMのSAM存在下での残存率が10%以上、好ましくは50%以上、又は、それぞれ0.1 mMのL-メチオニン及びSAMの存在下での活性が15%以上、好ましくは60%以上であるHTSは、L-メチオニンとSAMによる協奏阻害を解除されたHTSである。

【0040】

上記のような変異型HTSを保持する変異株は、親株を $\alpha$ -メチル-DL-メチオニン (MM) 存在下で、例えば1 g/lのMMを含む培地で培養し、生育する株を

選択することにより、取得することができる。MMによる選択は、複数回繰り返してもよい。

#### 【0041】

変異型HTSを保持する変異株は、上記のようにして得られるHTS変異株から変異型HTS遺伝子（変異型metA）をクローニングし、同変異型遺伝子で微生物を形質転換することによっても、取得することができる。変異型HTS遺伝子の単離、及び同遺伝子の微生物への導入は、前記の野生型HTS遺伝子と同様に行うことができる。変異型metA遺伝子として具体的には、配列番号26に示すアミノ酸配列において、27位のアルギニンがシステインに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、又は298位のプロリンがロイシンに置換する変異のいずれかに相当する変異を有するHTSが挙げられる。また、これらの変異の任意の2種又は3種を有するHTSも、好ましい変異型HTSである。

#### 【0042】

### <3>SAM合成酵素活性の弱化

さらに、細胞内のSAM合成酵素活性を弱化させることにより、微生物のL-メチオニン生産能を上昇させることができる。SAM合成酵素活性を欠損させることによっても、微生物のL-メチオニン生産能を上昇させることができるが、その場合は微生物を培養する培地にSAMを含有させる必要があるので、SAM合成酵素活性を弱化させることが好ましい。ここで、「SAM合成酵素活性を弱化させる」とは、微生物細胞タンパク質当たりのSAM合成酵素の比活性が、野生型SAM合成酵素を保持する株よりも低いことをいう。具体的には、弱化の程度は、野生株のSAM合成酵素に比べて80～50%、好ましくは50～30%、より好ましくは30～10%程度が挙げられる。E. coliでは、SAM合成酵素の比活性が10%より低下すると、細胞分裂が阻害されることが示唆されている（Newman, E. B. et al., J. Bacteriol., 180, 3614-3619 (1998)）。

#### 【0043】

SAM合成酵素活性が弱化した微生物は、酵素タンパク質当たりの比活性が低下したSAM合成酵素（弱化型SAM合成酵素）を産生するものであってもよい

し、SAM合成酵素遺伝子の転写効率又は翻訳効率が低下したことにより、酵素の発現効率が低下したものであってもよい。

#### 【0044】

SAM合成酵素活性が弱化した変異株は、親株をDL-ノルロイシン(NL)存在下で、例えば0.1g/lのNLを含む培地で培養し、生育する株を選択することにより、取得することができる。NLによる選択は、複数回繰り返してもよい。また、DL-ノルロイシンの代わりにエチオニン又は $\gamma$ -グルタミルメチルエステルを用いることも可能である。

#### 【0045】

弱化型SAM合成酵素を保持する変異株は、上記のようにして得られるSAM合成酵素弱化株から弱化型SAM合成酵素遺伝子をクローニングし、同変異型遺伝子で微生物染色体上の野生型SAM合成酵素遺伝子を置換することによっても、取得することができる。SAM合成酵素遺伝子の遺伝子置換は、前記のmetJ遺伝子と同様にして行うことができる。E. coliのSAM合成酵素遺伝子(metK)は、その塩基配列が知られているので(Blattner, F. R. et al., Science, 277, 1453-1462 (1997))、該塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いたPCRにより、染色体DNAから単離することができる。そのようなプライマーとして具体的には、配列番号11及び配列番号12に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。得られたmetK遺伝子に変異が生じていることは、該遺伝子の塩基配列を決定し、公知の野生型metK遺伝子の塩基配列と比較することにより、確認することができる。

#### 【0046】

弱化型SAM合成酵素をコードする遺伝子として具体的には、配列番号18に示すアミノ酸配列において、303番目のイソロイシンがロイシンに置換する変異、185番目のバリンがグルタミン酸に置換する変異、378番目のアルギニン以降がアラニン-メチオニン-ロイシン-プロリン-バリン(配列番号29)からなる配列に変化する変異のいずれかに相当する変異を有するSAM合成酵素が挙げられる。

#### 【0047】

#### <4> L-スレオニン要求性

微生物に L-スレオニン要求性を付与することにより、L-メチオニン生産能を向上させることができる。L-スレオニン要求性を示す微生物として具体的には、L-ホモセリンから L-スレオニンに至る L-スレオニン生合成の固有経路に関与する酵素にいずれかが欠損した微生物が挙げられる。E. coli においては、L-スレオニンの生合成に関与する酵素の遺伝子は、スレオニンオペロン (thrABC) として存在し、thrBC 部分を欠失させることによって L-ホモセリン以降の生合成能を失った L-スレオニン要求株を取得することができる。尚、thrA 遺伝子は L-メチオニン及び L-スレオニンの共通経路の酵素であるアスパルトキナーゼのアイソザイムの一つをコードしており、欠失させないことが好ましい。

【0048】

thrBC を欠失させるには、染色体 DNA 上のスレオニンオペロン中の thrBC 部分を破壊すればよい。thrBC の破壊は、一部を欠失した thrBC で微生物染色体上の thrBC 部分を置換することによって行うことができる。thrBC の遺伝子置換は、前記 metJ 遺伝子の遺伝子置換と同様に行えばよい。欠失を含む thrBC は、E. coli 染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 1 及び 2 に示す塩基配列を有するプライマーを用いて PCR により thrB 遺伝子の上流部分を含む約 1 kb の断片を増幅し、同様に配列番号 3 及び 4 に示す塩基配列を有するプライマーを用いて PCR により thrC 遺伝子の下流部分を含む約 1 kb の断片を増幅し、これらの増幅断片を連結することによって取得することができる。

【0049】

#### <5> L-メチオニンの製造

上記のようにして得られる L-メチオニン生産能を有する微生物を培地に培養し、該培地中に L-メチオニンを生産蓄積せしめ、これを該培地から採取することにより、L-メチオニンを製造することができる。

【0050】

使用する培地は、微生物に応じて従来より用いられてきた周知の培地を用いてかまわない。つまり、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。本発明を実施するための特別な培地は必要と

されない。

【0051】

炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぷんの加水分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類等を用いることができる。

【0052】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0053】

有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-スレオニン、L-チロシンなどの要求物質または酵母エキスを適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

【0054】

培養は、利用される微生物に応じて従来より用いられてきた周知の条件で行ってかまわない。例えば、好氣的条件下で16～120時間培養を実施するのがよく、培養温度は25℃～45℃に、培養中pHは5～8に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

【0055】

培養終了後の培地液からのL-メチオニンの採取は、本願発明において特別な方法が必要とされることはない。すなわち、本発明は従来より周知となっているイオン交換樹脂法、沈澱法その他の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0056】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0057】

【実施例1】 エシェリヒア・コリW3110株からのL-スレオニン要求株及びm

## etJ欠損株の取得

## &lt;1&gt;欠失を有する thrBC 構造遺伝子を含む組換え用プラスミドの調製

ゲノムDNA精製キット（アドバンスドジェネティクテクノロジー社製）を用い、その指示に従って *E. coli* の野生型 K-12 株の誘導体である W3110 株から染色体 DNA を調製した。配列表の配列番号 1 及び配列番号 2 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。これをプライマーとし、前記染色体 DNA を鋳型として、エルリッチらの方法（PCR Technology-Principles and Applications for DNA Amplification, ed. Erlich, H. A., Stockton Press）に従って、PCR 反応を行い、thrB 遺伝子の上流部分を含む約 1 kb の断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端にプライマーに由来する EcoRI 及び SalI の認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。

【0058】

同様に、配列番号 3 及び配列表番号 4 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR 反応を行い、thrC 遺伝子の下流部分を含む約 1 kb の断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端にプライマーに由来する SalI 及び HindIII の認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。上記 2 つの増幅断片と、EcoRI 及び HindIII で切断した pHS398（宝酒造社製）とを、ライゲーションキット（宝酒造）を用いて連結し、*E. coli* JM109 コンピテントセル（宝酒造）を形質転換した。形質転換体からプラスミドを、プラスミド抽出機 PI-50（倉敷紡績社製）を用いてアルカリ法（Boirnbom, H. C. et al., Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523 (1979)）に基づいて調製した。得られた組換えプラスミドから、EcoRI 及び HindIII 認識部位に 2 つの断片が SalI 認識部位を介して挿入されたプラスミドを、挿入断片の長さによって選択した。このプラスミドは、thrBC の構造遺伝子の上流と下流を含んでおり、thrBC の構造遺伝子のほぼ全長が欠失した遺伝子断片を含んでいる。

【0059】

## &lt;2&gt;遺伝子組換えによる thrBC 構造遺伝子欠損株の作製

上記プラスミドと、特願平9-194603号に記載の温度感受性複製起点を有するプラスミドpMAN997を、EcoRI及びHindIIIで切断した後、これらを連結し、得られた組換えプラスミドでE. coli JM109株を形質転換した。形質転換体からプラスミドを抽出し、pMAN997にthrBC欠失遺伝子断片が挿入された構造を有するものを選択し、pMAN $\Delta$ BCとした。このプラスミドを用いてW3110株を形質転換し、常法に従って遺伝子組換えを行った。すなわち、組換え株の選択は、M9培地 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual/Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, A.3 (1989)) におけるL-スレオニン要求性によって行い、得られたL-スレオニン要求株をW $\Delta$ BC株とした。

## 【0060】

<3>W3110株及びW $\Delta$ BC株からのmetJ欠損株の作製

次に、W3110株染色体DNAを鋳型とし、配列番号5及び配列番号6記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行い、metB遺伝子を含む約1 kbの断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端にEcoRI及びSphIの認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。

## 【0061】

同様に配列番号7及び配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行い、metJ遺伝子の下流部分を含む約1 kbの断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端にHindIII及びEcoRIの認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。

## 【0062】

次に、配列番号9に示した、両端にSphI及びHindIII認識部位を有し、スレオニンオペロンのプロモーター配列を有する配列を、配列番号10に示した相補鎖とともに合成し、これらをアニールさせた後に、制限酵素SphI及びHindIIIで切断した。このようにして得たスレオニンプロモーター断片と、EcoRIで切断したpHSG298 (宝酒造社製) と、前記2つのPCR増幅断片とを混合した後、連結反応を行った。この連結反応液で、JM109株を形質転換し、形質転換体からプラスミド

を抽出した。得られた組換えプラスミドから、4者が連結されたプラスミドを選択した。このプラスミドは、*metJ*の構造遺伝子が欠失し、*metBL*オペロンのプロモーターがスレオニンプロモーターに置き換わった構造を有している。

## 【0063】

上記で得られたプラスミド、及び特願平9-194603号に記載の温度感受性複製起点を有するプラスミドpMAN997をEcoRIで切断し、ライゲーションを行い、pMAN997に*metJ*欠失断片が挿入された構造を有するものを選択し、pMANΔ*J*とした。このプラスミドを用いてW3110株及びWΔBC株を形質転換し、常法に従って遺伝子組換えを行った。得られた組換え株は、菌体から調製したDNAを鋳型とし、配列番号6及び配列番号8に示したオリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCR法による増幅産物の長さで選択した。W3110株及びWΔBC株から得られた*metJ*欠失株を、それぞれWΔ*J*株及びWΔBCΔ*J*株とした。

## 【0064】

組換えによる*metJ*欠失の効果を確認するため、菌体から粗酵素抽出液を調製し、HTS及びシスタチオニン合成酵素の活性を測定した。W3110株とWΔ*J*株を2mlのLB培地に植菌し、37℃で一晩培養した。この培養液1mlを5,000rpmで10分間遠心分離し、菌体を0.9%の食塩水で2度洗浄した。得られた菌体を1mlの0.9%食塩水に懸濁し、そのうちの0.5mlを、50mlの5mMのL-メチオニンを含むデイビス・ミンジョリ最少培地 (Davis, B. D., and Mingioli, E. S., J. Bacteriol. 60, 17-28 (1950)) に植菌した。これを37℃で24時間培養し、培養液を8,000rpmで10分間遠心分離し、菌体を0.9%食塩水で2度洗浄した。菌体を3mlの1mMジチオスレイトールを含む50mMリン酸カリウムバッファー (pH7.5) に懸濁した。この懸濁液を超音波破碎機 (久保田社製) を用いて、4℃にて150Wで5分間細胞破碎処理を行った。破碎液を15,000rpmで30分間遠心処理した上清をセファデックスG-50カラム (ファルマシア社製) にて脱塩処理したものを粗酵素抽出液とした。粗酵素抽出液中のHTS活性とシスタチオニン合成酵素の活性を測定した。

## 【0065】

HTS活性は、粗酵素抽出液5μlを0.1Mリン酸カリウム (pH7.5)、1mMサクシニルコエンザイムA (シグマ社製)、0.2nM DL-[<sup>14</sup>C]ホモセリン (室町化学工



業社製)、及び0.2mM L-ホモセリンからなる反応液に加えて50  $\mu$ lとし、30℃で10分間反応を行った。反応液1  $\mu$ lを、セルロースプレート(メルク社製)にスポットし、アセトン、ブタノール、水、ジエチルアミンを10:10:5:2の割合で含む添加溶媒で展開した。プレートを風乾した後、イメージアナライザー(富士写真工業社製)にてオートラジオグラフィーを行った。

## 【0066】

シスタチオニン合成酵素は、L-システイン非存在下ではO-サクシニルホモセリンを $\alpha$ -ケト酪酸、アンモニア及びコハク酸を生じることが知られており、簡便な検出方法として利用できる(Holbrook, E. L. et al., Biochemistry 29, 435-442 (1990))。粗酵素抽出液100  $\mu$ lを、0.2Mトリス-塩酸(pH8)、5mM O-サクシニルホモセリン(シグマ社製)、及び0.25mMピリドキサルリン酸(シグマ社製)からなる反応液に加え1mlとし、37℃で20分間反応を行った後氷冷した。この反応液中のO-サクシニルホモセリンを逆相HPLC(ジューエルサイエンス社製)で定量し、粗酵素抽出液非添加の反応液から減少したO-サクシニルホモセリン量を算出した。ピリドキサルリン酸非添加の反応を同時に行い、ピリドキサルリン酸依存のO-サクシニルホモセリン減少を、シスタチオニン合成酵素活性とした。

## 【0067】

上記のようにして測定したHTS活性とシスタチオニン合成酵素のそれぞれの比活性の測定結果を表1に示した。HTS活性はW3110株ではL-メチオニン添加の効果によりほとんど検出されないが、W $\Delta$ J株においては顕著な活性を示した。シスタチオニン合成酵素活性も、W $\Delta$ J株においてはW3110株に比して顕著な増大が認められた。これらの結果から組換えによるmetJ欠失とmetBLオペロンのプロモーター置換の効果が確認された。

## 【0068】

【表 1】

表 1 : metJ 欠損株における HTS 活性及びシタチオン合成酵素活性

菌株	HTS 活性 (mmol/min/mg蛋白質)	シタチオン合成酵素活性 (mmol/min/mg蛋白質)
W3110	0.3	140
WΔJ	126	1300

【0069】

## 【実施例 2】 W3110 株からの metK 変異株の取得

W3110 株を LB 培地 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual/Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, A.1 (1989)) にて 37℃ で一晚培養した。培養した培養液 1 ml を 5,000rpm で 10 分間遠心分離し、菌体を 0.9% の食塩水で 2 度洗浄した。得られた菌体を 100  $\mu$ l の 0.9% 食塩水に懸濁し、そのうちの 10  $\mu$ l を 5 ml の 0.1g/l の DL-ノルロイシン (NL) を含むデイベス-ミンジオリ最少培地に植菌した。これを 37℃ で 5 日間培養した。

【0070】

生育してきたコロニーの幾つかを LB 寒天培地上でコロニー分離し、再度 0.1g/l の NL を含むデイベス-ミンジオリ最小培地での生育を確認し、12 株の NL 耐性株を選抜した。これらの耐性株から染色体 DNA を調製した。これを鋳型として配列番号 11 及び 12 に示す配列を有する 2 種のプライマーを用いて PCR 反応を行い metK 遺伝子の増幅を行った。この増幅断片の塩基配列を、配列番号 11 及び 12 に示した増幅用プライマー、及び配列番号 13、14、15、及び 16 に示す配列を有するプライマーを用いて決定した。塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシーケンシングキット (パーキンエルマー社製) を用いて、373S 型 DNA シーケンサー (パーキンエルマー社製) にてそれぞれの指示に従って行っ

た。対照として決定した野生株W3110の塩基配列はブラットナーらが報告しているmetKの配列 (Blattner, F. R. et al., Science, 277, 1453-1462 (1997)) と完全に一致した。この配列を配列番号17に示した。また、この配列がコードし得るSAM合成酵素のアミノ酸配列を配列番号18に示した。

#### 【0071】

NL耐性株のうち、metKの構造遺伝子中に変異点が見いだされたものは12株の内3株あり、これらをWNL2、WNL24、及びWNL32と名付けた。これらの変異株のmetK塩基配列は、配列番号17に示す野生型の塩基配列上で、WNL2株では907番目のアデニンがシトシンに、WNL24株では554番目のチミンがアデニンに、WNL32株では1132番目のシトシン塩基の欠失が認められた。この結果、配列番号18に示したSAM合成酵素のアミノ酸配列において、WNL2株のSAM合成酵素は303番目のイソロイシンがロイシンに、WNL24株では185番目のバリンがグルタミン酸に、WNL32株では1塩基欠失によって378番目のアルギニン以降がアラニン-メチオニン-ロイシン-プロリン-バリンからなる配列に変化していることが明らかとなった。これらの株はSAM合成酵素活性が弱化していることが推定された。

#### 【0072】

【実施例3】 metK変異の導入と野生型metA遺伝子の増幅によるL-メチオニン生産

##### (1) W $\Delta$ BC $\Delta$ J株へのmetK変異の導入

metK遺伝子変異株であるWNL2株、WNL24株、及びWNL32株の染色体DNAを鋳型とし、配列番号19及び配列番号20記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行い、metK遺伝子を含む約2.5kbの断片の増幅を行った。この増幅断片は両端にHindIIIの認識配列が導入されている。得られた増幅断片をそれぞれHindIIIで切断した。HindIIIで切断したpSTV28 (宝酒造社製) 及びPCR増幅断片を混合後連結反応を行い、JM109株を形質転換した。形質転換体からプラスミドを抽出した。得られた組換えプラスミドからPCR増幅断片が挿入されたプラスミドを選択した。これらのプラスミドはmetKの構造遺伝子に変異を有していることを塩基配列を決定し確認した。

## 【0073】

これらのプラスミドのHindIII切断断片を、HindIIIで切断したpMAN997にクローニングし、それぞれpMANK-2, pMANK-24, pMANK-32と名付けた。これらのプラスミドを用いてW $\Delta$ BC $\Delta$ J株を形質転換し、常法に従って遺伝子組換えを行った。組換え株から染色体DNAを抽出して鋳型とし、配列番号11及び配列番号12に示したオリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCR法による増幅産物の塩基配列を調べた。それぞれの変異が認められたものを選択した。得られたW $\Delta$ BC $\Delta$ J株由来のmetK変異株をそれぞれW $\Delta$ BC $\Delta$ JK-2株、W $\Delta$ BC $\Delta$ JK-24株、及びW $\Delta$ BC $\Delta$ JK-32株とした。

## 【0074】

## (2) metA遺伝子の増幅

W3110株染色体DNAを鋳型とし、配列番号21及び配列番号22記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行い、metA遺伝子を含む約1 kbの断片の増幅を行った。この増幅断片は両端にそれぞれSphI及びSalIの認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。これをSphI及びSalIで切断したpHSG398にクローニングした。挿入断片の塩基配列を配列番号21及び22に示した増幅用プライマー、並びに配列番号23及び24に示す配列を有するプライマーを用いて決定した。決定した野生株W3110のmetAの塩基配列はブラットナーらが報告しているmetAの配列 (Blattner, F. R. et al., Science, 277, 1453-1462 (1997)) と完全に一致した。この配列を配列番号25に示した。また、この配列がコードし得るHTSのアミノ酸配列を配列番号26に示した。

## 【0075】

このプラスミドのSphI及びSalIによる切断物、実施例1に記載のスレオニンプロモーターのHindIII及びSphIによる切断物、及びHindIII及びSalIで切断したpMW118 (日本ジーン社製) を混合後、連結反応を行った。この反応液でJM109株を形質転換し、形質転換体からプラスミドを抽出した。得られた組換えプラスミドから3者が連結されたプラスミドを選択した。このプラスミドはスレオニンプロモーターの下流にmetA遺伝子が配置されており、スレオニンプロモーターにより

metAが発現する構造をとっている。このプラスミドをpMWPthmetA-Wと名付けた。このプラスミドを用いてW3110株、WΔBC株、WΔBCΔJ株、WΔBCΔJK-2株、WΔBCΔJK-24株、及びWΔBCΔJK-32株を形質転換し、形質転換体を得た。

【0076】

各形質転換体を50mg/lのアンピシリンを含むLBプレート上、37℃で一晩培養した。菌体をグルコース40g/l、硫酸マグネシウム1g/l、硫酸16g/l、リン酸二水素カリウム1g/l、酵母抽出物 (Bacto Yeast-Extract (Difco)) 2g/l、硫酸マンガン0.01g/l、硫酸鉄0.01g/l、炭酸カルシウム30g/l、アンピシリン50mg/l、L-スレオニン0.5g/lを含むpH7の培地20mlに植菌し、37℃で48時間培養した。

【0077】

培養物から菌体を除き、アミノ酸分析計（日立社製）にてL-メチオニン量を測定した。この結果を表3に示した。W3110株では認められなかったL-メチオニンが、WΔBC株、WΔBCΔJ株において増加した。metKの変異は、WΔBCΔJK-2株ではL-メチオニン量は低下したものの、WΔBCΔJK-32株においては同等、WΔBCΔJK-24株では上昇が認められ、L-メチオニン生産に効果が認められた。プラスミドpMWPthrmetA-Wを保持したWΔBCΔJK-24株は、プライベートナンバーAJ13425が付与され、平成10年5月14日より、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に寄託されており、受託番号FERM P-16808が付与されている。

【0078】

【表 2】

表 2 : 野生型metA導入株のL-メチオニン生産量

菌株	生成量 (g/l)
W3110/pMWPthrmetA-W (metA <sup>+</sup> )	0.000
WΔBC/pMWPthrmetA-W (thrBC <sup>-</sup> , metA <sup>+</sup> )	0.008
WΔBCΔJ/pMWPthrmetA-W (metBL <sup>+</sup> , thrBC <sup>-</sup> , metA <sup>+</sup> )	0.022
WΔBCΔJK-2/pMWPthrmetA-W (thrBC <sup>-</sup> , metJ <sup>-</sup> , metBL <sup>+</sup> , metK <sup>l</sup> , metA <sup>+</sup> )	0.014
WΔBCΔJK-24/pMWPthrmetA-W (thrBC <sup>-</sup> , metJ <sup>-</sup> , metBL <sup>+</sup> , metK <sup>l</sup> , metA <sup>+</sup> )	0.141
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-W (thrBC <sup>-</sup> , metJ <sup>-</sup> , metBL <sup>+</sup> , metK <sup>l</sup> , metA <sup>+</sup> )	0.023

metK<sup>l</sup> : 弱化型metK, metA<sup>+</sup> : metA増強, metBL<sup>+</sup> : metBL増強

【0079】

#### 【実施例 4】 metA変異株及び阻害解除型metA遺伝子の取得

W3110株を2mlのLB培地に植菌し、37℃で8時間培養した。この培養液1mlを5,000rpmで10分間遠心分離し、菌体を0.9%の食塩水で2度洗浄した。得られた菌体を100μlの0.9%食塩水に懸濁し、そのうちの5μlを5mlの1g/lのα-メチル-DL-メチオニン(MM)を含むデイビス-ミンジオリ最少培地に植菌した。これを37℃で3日間培養した。この培養液を適当に希釈の後、1g/lのMMを含むデイビス-ミンジオリ最少培地に塗布し、37℃で一晩培養した。生育してきたコロニーの幾つかをLB寒天培地上でコロニー分離し、再度1g/lのMMを含むデイビス-ミンジオリ最小培地での生育を確認した。この操作を9回独立に行い、6個の独立した耐性株を得て、それぞれをWMM4、WMM5、WMM6、WMM7、WMM8、及びWMM9と名付けた。

【0080】

これらの耐性株から染色体DNAを調製した。これを鋳型として配列番号21及び22に示す配列を有するプライマーを用いてPCR反応を行いmetA遺伝子の増

幅を行った。この増幅断片の塩基配列を配列番号 2 1 及び 2 2 に示した増幅用プライマー、並びに配列番号 2 3 及び 2 4 に示す配列を有するプライマーを用いて決定した。耐性株の *metA* 塩基配列は、配列番号 2 5 に示す野生型 *metA* の塩基配列上で、WMM4 株では 887 番目のチミンがグアニンに、WMM5 株では 893 番目のシトシンがチミンに、WMM6 株では野生型、WMM7 及び WMM8 株では 886 番目から 890 番目の塩基に相当する ATCTC なる配列が反復して存在しその間に約 1300 塩基からなる IS2 と呼ばれる挿入配列 (Ghosal, D. et al., *Nucleic Acids Res.* 6, 1111-1122 (1979)) が存在し、WMM9 株では 79 番目のシトシンがチミンに変化していた。この結果、配列番号 2 6 に示した HTS のアミノ酸配列において、WMM4 株の HTS は 296 番目のイソロイシンがセリンに、WMM5 株では 298 番目のプロリンがロイシンに、WMM7 及び WMM8 株では挿入配列によって 298 番目のプロリン以降がアルギニン-ロイシン-アラニン-プロリンからなる配列に、WMM9 株では 27 番目のアルギニンがシステインに変化していることが明らかとなった。

#### 【0081】

*metA* 構造遺伝子に変異が認められた WMM4、WMM5、WMM9、及び WMM7 株を LB 培地にて 37℃ で一晚試験管培養した培養液 1 ml を 5,000rpm で 10 分間遠心した後、1 ml の 0.9% の食塩水で 2 度洗浄した。これを 1 ml の 0.9% の食塩水に懸濁し、0.5ml を 50ml の最少培地に植菌し、37℃ で一日培養した。培養液を 8,000rpm で 10 分間遠心した後、1 ml の 0.9% の食塩水で 2 度洗浄した。得られた菌体を 3 ml の 50mM リン酸カリウム (pH7.5)、1 mM ジチオスレイトールからなる緩衝液に懸濁し、実施例 1 に示したのと同じ操作を行い粗酵素抽出液を得た。粗酵素抽出液中の HTS 活性を、阻害剤の存在下で実施例 1 に記載の反応組成で測定した結果を、表 2 に示した。WMM7 株については活性を検出することが出来なかったが、これは挿入配列によるアミノ酸配列の変化により比活性が大きく低下したものと考えられた。それ以外の株の比活性は野生株の約 1/4 程度であった。MM による阻害は WMM4、WMM5、及び WMM9 株のいずれにおいても解除されており、L-メチオニンによる阻害もかなり緩和していた。SAM による阻害は WMM9 株でほとんど解除が認められなかったが、WMM4 及び WMM5 株では解除する傾向が認められた。野生株 HTS 活性に最も強力な阻害を示した L-メチオニン及び SAM の組合わせも WMM4 及び WMM5 株で顕

著な緩和が認められた。

【0082】

【表3】

表3：各種阻害剤存在下におけるMM耐性株由来のHTSの活性

阻 害 剤	H T S 活 性 (mmol/min/mg蛋白質)				
	W3110	WMM9	WMM4	WMM5	WMM7
非添加	22.3	5.0	4.5	4.5	0.0
0.1mM MM	18.6	4.9	4.1	4.6	0.0
1mM MM	7.0	2.7	4.6	4.8	0.0
0.1mM Met	14.3	2.5	4.5	4.2	0.0
1mM Met	0.8	2.2	4.0	4.0	0.0
0.1mM SAM	17.0	1.1	4.6	3.6	0.0
1mM SAM	3.0	0.5	2.6	3.3	0.0
0.1mM SAM+0.1mM Met	0.0	0.9	5.6	2.8	0.0

【0083】

【実施例5】変異型metAの導入によるL-メチオニン生産

実施例4で得られたmetAの変異株のうち、WMM9株、WMM4株、及びWMM5株の染色



体DNAを鋳型とし、配列番号21及び配列番号22記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてそれぞれPCR反応を行い、*metA*遺伝子を含む断片を増幅した。この増幅断片は、両端にSphI及びSalIの認識配列が導入されている。この増幅断片の両端をSphI及びSalIで切断し、SphI及びSalIで切断したpHSG398にクローニングした。挿入断片の塩基配列を決定し、変異点を確認した。このプラスミドのSphI及びSalIによる切断物、実施例1に記載のスレオニンプロモーターのHindIII及びSphIによる切断物、及びHindIII及びSalIで切断したpMW118（日本ジーン社製）を混合後、連結反応を行った。この反応液でJM109株を形質転換し、形質転換体からプラスミドを抽出した。得られた組換えプラスミドから3者が連結されたプラスミドを選択した。これらをそれぞれpMWPthr*metA*-9、pMWPthr*metA*-4、及びpMWPthr*metA*-5と名付けた。

#### 【0084】

さらに各変異型*metA*遺伝子の変異点を組み合わせるため、部位特異的変異導入をMutan-Super Express Km（宝酒造社製）を用いてその指示に従って行った。配列番号27記載の配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて、*metA*-4変異に*metA*-9変異を組合わせてpMWPthr*metA*-9+4を作製した。同様に*metA*-5変異に*metA*-9変異を組合わせてpMWPthr*metA*-9+5を作製した。さらに配列番号28記載の配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて、*metA*-9変異に*metA*-4及び*metA*-5変異を組合わせてpMWPthr*metA*-9+4+5を作製した。

#### 【0085】

これらのプラスミドを用いてWΔBCΔJK-32株を形質転換し、形質転換体を得た。各形質転換体を、50mg/lのアンピシリンを含むLBプレート上、37℃で一晩培養した。菌体をグルコース40g/l、硫酸マグネシウム1g/l、硫酸16g/l、リン酸二水素カリウム1g/l、酵母抽出物（Bacto Yeast-Extract (Difco) 2g/l、硫酸マンガン0.01g/l、硫酸鉄0.01g/l、炭酸カルシウム30g/l、アンピシリン50mg/l、L-スレオニン0.5g/lを含むpH7の培地20mlに植菌し、37℃で48時間培養した。培養物から菌体を除き、アミノ酸分析計（日立社製）にてL-メチオニン量を測定した。この結果を表4に示した。L-メチオニン蓄積量は、野生型*metA*を導入した株に比べて、変異型の*metA*を導入した株では数倍増加した。さらに変異を組

合わせることによって、L-メチオニン生産量のさらなる増加が認められた。

【0086】

【表4】

表4：変異型metA導入株のL-メチオニン生産量

菌 株	L-メチオニン生成量 (g/l)
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-W	0.023
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-9	0.158
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-4	0.108
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-5	0.131
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-9+4	0.206
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-5+9	0.207
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-9+4+5	0.236

【0087】

【発明の効果】

本発明により、L-メチオニン生産能を有する微生物が提供される。同微生物は、L-メチオニン生産菌として、また、L-メチオニン生産菌の育種の材料として利用することができる。

本発明の変異型metA遺伝子は、L-メチオニン及びSAMによる協奏阻害が解除されているので、L-メチオニン生産菌の育種に利用することができる。

【0088】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Ltd)

<120> 発酵法による L-メチオニンの製造法 (Method for Producing L-Methionine by Fermentation)

<130> P-6041

<141> 1998-11-17

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0089】

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

gggaattctg gcaggaggaa ctggcgca

28

【0090】

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

gggtcgacgc tcatattggc actggaag

28

【0091】

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

gggtcgacat cagtaaaatc tattcatt

28

【 0 0 9 2 】

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

ggaagcttgc ccgagggaaa gatctgta

28

【 0 0 9 3 】

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

gggcatgccc agggaacttc atcacatg

28

【 0 0 9 4 】

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

gggaattctc atggttgagg cgtgagag

28

【 0 0 9 5 】

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

ggaagcttgc gtgagatggg gattaacc

28

【 0 0 9 6 】

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

gggaattcta ctgctagctg ctcttgag

28

【 0 0 9 7 】

<210> 9

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

ggaagcttaa aattttattg acttaggtca ctaaatactt taaccaatat aggcatagcg 60  
cacagacgca tgccc 75

【 0 0 9 8 】

<210> 10

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

gggcatgcgt ctgtgcgcta tgcctatatt gggttaaagta tttagtgacc taagtcaata 60  
aaattttaag cttcc 75

【 0 0 9 9 】

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

caacagtttg agctaacc 18

【 0 1 0 0 】

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

gcggtttttt tgccggatgc

20

【 0 1 0 1 】

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

tcggctacgc aactaatg

18

【 0 1 0 2 】

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

gagaatgcac cgccaccg

18

【 0 1 0 3 】

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

tggcgcgtca cggtggcg

18

【 0 1 0 4 】

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

gcacgtcggg ttcattag

18

【 0 1 0 5 】

<210> 17

<211> 1155

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1152)

<400> 17

atg gca aaa cac ctt ttt acg tcc gag tcc gtc tct gaa ggg cat cct 48

Met Ala Lys His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro

1 5 10 15

gac aaa att gct gac caa att tct gat gcc gtt tta gac gcg atc ctc 96

Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu

20 25 30

gaa cag gat ccg aaa gca cgc gtt gct tgc gaa acc tac gta aaa acc 144

Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr

35 40 45



ggc atg gtt tta gtt ggc ggc gaa atc acc acc agc gcc tgg gta gac	192
Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp	
50 55 60	
atc gaa gag atc acc cgt aac acc gtt cgc gaa att ggc tat gtg cat	240
Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His	
65 70 75 80	
tcc gac atg ggc ttt gac gct aac tcc tgt gcg gtt ctg agc gct atc	288
Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile	
85 90 95	
ggc aaa cag tct cct gac atc aac cag ggc gtt gac cgt gcc gat ccg	336
Gly Lys Gln Ser Pro Asp Ile Asn Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp Pro	
100 105 110	
ctg gaa cag ggc gcg ggt gac cag ggt ctg atg ttt ggc tac gca act	384
Leu Glu Gln Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr	
115 120 125	
aat gaa acc gac gtg ctg atg cca gca cct atc acc tat gca cac cgt	432
Asn Glu Thr Asp Val Leu Met Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His Arg	
130 135 140	
ctg gta cag cgt cag gct gaa gtg cgt aaa aac ggc act ctg ccg tgg	480
Leu Val Gln Arg Gln Ala Glu Val Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro Trp	
145 150 155 160	
ctg cgc ccg gac gcg aaa agc cag gtg act ttt cag tat gac gac ggc	528
Leu Arg Pro Asp Ala Lys Ser Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp Asp Gly	
165 170 175	
aaa atc gtt ggt atc gat gct gtc gtg ctt tcc act cag cac tct gaa	576
Lys Ile Val Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu	
180 185 190	
gag atc gac cag aaa tcg ctg caa gaa gcg gta atg gaa gag atc atc	624
Glu Ile Asp Gln Lys Ser Leu Gln Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile	

195	200	205	
aag cca att ctg ccc gct gaa tgg ctg act tct gcc acc aaa ttc ttc			672
Lys Pro Ile Leu Pro Ala Glu Trp Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe Phe			
210	215	220	
atc aac ccg acc ggt cgt ttc gtt atc ggt ggc cca atg ggt gac tgc			720
Ile Asn Pro Thr Gly Arg Phe Val Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys			
225	230	235	240
ggt ctg act ggt cgt aaa att atc gtt gat acc tac ggc ggc atg gcg			768
Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala			
245	250	255	
cgt cac ggt ggc ggt gca ttc tct ggt aaa gat cca tca aaa gtg gac			816
Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val Asp			
260	265	270	
cgt tcc gca gcc tac gca gca cgt tat gtc gcg aaa aac atc gtt gct			864
Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala			
275	280	285	
gct ggc ctg gcc gat cgt tgt gaa att cag gtt tcc tac gca atc ggc			912
Ala Gly Leu Ala Asp Arg Cys Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile Gly			
290	295	300	
gtg gct gaa ccg acc tcc atc atg gta gaa act ttc ggt act gag aaa			960
Val Ala Glu Pro Thr Ser Ile Met Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys			
305	310	315	320
gtg cct tct gaa caa ctg acc ctg ctg gta cgt gag ttc ttc gac ctg			1008
Val Pro Ser Glu Gln Leu Thr Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe Asp Leu			
325	330	335	
cgc cca tac ggt ctg att cag atg ctg gat ctg ctg cac ccg atc tac			1056
Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Gln Met Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr			
340	345	350	
aaa gaa acc gca gca tac ggt cac ttt ggt cgt gaa cat ttc ccg tgg			1104

Lys Glu Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu His Phe Pro Trp  
 355 360 365  
 gaa aaa acc gac aaa gcg cag ctg ctg cgc gat gct gcc ggt ctg aag 1152  
 Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys  
 370 375 380  
 taa 1155

【 0 1 0 6 】

<210> 18

<211> 384

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 18

Met Ala Lys His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu  
 20 25 30  
 Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr  
 35 40 45  
 Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp  
 50 55 60  
 Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His  
 65 70 75 80  
 Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile  
 85 90 95  
 Gly Lys Gln Ser Pro Asp Ile Asn Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp Pro  
 100 105 110  
 Leu Glu Gln Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr  
 115 120 125  
 Asn Glu Thr Asp Val Leu Met Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His Arg

130	135	140	
Leu Val Gln Arg Gln Ala Glu Val Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro Trp			
145	150	155	160
Leu Arg Pro Asp Ala Lys Ser Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp Asp Gly			
	165	170	175
Lys Ile Val Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu			
	180	185	190
Glu Ile Asp Gln Lys Ser Leu Gln Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile			
	195	200	205
Lys Pro Ile Leu Pro Ala Glu Trp Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe Phe			
	210	215	220
Ile Asn Pro Thr Gly Arg Phe Val Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys			
225	230	235	240
Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala			
	245	250	255
Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val Asp			
	260	265	270
Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala			
	275	280	285
Ala Gly Leu Ala Asp Arg Cys Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile Gly			
	290	295	300
Val Ala Glu Pro Thr Ser Ile Met Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys			
305	310	315	320
Val Pro Ser Glu Gln Leu Thr Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe Asp Leu			
	325	330	335
Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Gln Met Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr			
	340	345	350
Lys Glu Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu His Phe Pro Trp			
	355	360	365

Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys

370

375

380

【 0 1 0 7 】

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

ggaagcttaa gcagagatgc agagtgcg

28

【 0 1 0 8 】

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

ggaagcttgg tgcggtataa gaggccac

28

【 0 1 0 9 】

<210> 21

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

gggcatgctg tagtgaggta atcaggtt

28

【 0 1 1 0 】

<210> 22

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 22

gggtcgactt aatccagcgt tggattca

28

【 0 1 1 1 】

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 23

tgtctgctgg gcggtaca

18

【 0 1 1 2 】

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 24

agagagtttt tcggtgcg

18

【 0 1 1 3 】

<210> 25

<211> 930

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(927)

<400> 25

atg ccg att cgt gtg ccg gac gag cta ccc gcc gtc aat ttc ttg cgt	48
Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg	
1 5 10 15	
gaa gaa aac gtc ttt gtg atg aca act tct cgt gcg tct ggt cag gaa	96
Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu	
20 25 30	
att cgt cca ctt aag gtt ctg atc ctt aac ctg atg ccg aag aag att	144
Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile	
35 40 45	
gaa act gaa aat cag ttt ctg cgc ctg ctt tca aac tca cct ttg cag	192
Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln	
50 55 60	
gtc gat att cag ctg ttg cgc atc gat tcc cgt gaa tcg cgc aac acg	240
Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr	
65 70 75 80	
ccc gca gag cat ctg aac aac ttc tac tgt aac ttt gaa gat att cag	288
Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln	
85 90 95	
gat cag aac ttt gac ggt ttg att gta act ggt gcg ccg ctg ggc ctg	336
Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu	
100 105 110	
gtg gag ttt aat gat gtc gct tac tgg ccg cag atc aaa cag gtg ctg	384

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu	
115 120 125	
gag tgg tcg aaa gat cac gtc acc tcg acg ctg ttt gtc tgc tgg gcg	432
Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala	
130 135 140	
gta cag gcc gcg ctc aat atc ctc tac ggc att cct aag caa act cgc	480
Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg	
145 150 155 160	
acc gaa aaa ctc tct ggc gtt tac gag cat cat att ctc cat cct cat	528
Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His	
165 170 175	
gcg ctt ctg acg cgt ggc ttt gat gat tca ttc ctg gca ccg cat tcg	576
Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser	
180 185 190	
cgc tat gct gac ttt ccg gca gcg ttg att cgt gat tac acc gat ctg	624
Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu	
195 200 205	
gaa att ctg gca gag acg gaa gaa ggg gat gca tat ctg ttt gcc agt	672
Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser	
210 215 220	
aaa gat aag cgc att gcc ttt gtg acg ggc cat ccc gaa tat gat gcg	720
Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala	
225 230 235 240	
caa acg ctg gcg cag gaa ttt ttc cgc gat gtg gaa gcc gga cta gac	768
Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp	
245 250 255	
ccg gat gta ccg tat aac tat ttc ccg cac aat gat ccg caa aat aca	816
Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr	
260 265 270	



ccg cga gcg agc tgg cgt agt cac ggt aat tta ctg ttt acc aac tgg 864

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp

275

280

285

ctc aac tat tac gtc tac cag atc acg cca tac gat cta cgg cac atg 912

Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met

290

295

300

aat cca acg ctg gat taa

930

Asn Pro Thr Leu Asp

305

【 0 1 1 4 】

<210> 26

<211> 309

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 26

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg

1

5

10

15

Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu

20

25

30

Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile

35

40

45

Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln

50

55

60

Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr

65

70

75

80

Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln

85

90

95

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu

100

105

110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu

115

120

125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala

130

135

140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg

145

150

155

160

Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His

165

170

175

Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser

180

185

190

Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu

195

200

205

Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser

210

215

220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala

225

230

235

240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp

245

250

255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr

260

265

270

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp

275

280

285

Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met

290

295

300

Asn Pro Thr Leu Asp

305

【 0 1 1 5 】

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 27

ccagacgcac aagaagttgt c

21

【 0 1 1 6 】

<210> 28

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 28

tagatcgtat agcgtgctct ggtagac

27

【 0 1 1 7 】

<210> 29

<211> 309

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 29

Ala Met Leu Pro Val

5

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 L-メチオニン生産能を有する微生物を育種し、同微生物を用いて発酵法によりL-メチオニンを製造する。

【解決手段】 L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、及び／又は、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、好ましくは、さらに細胞内のS-アデノシルメチオニンシンテース活性が弱化し、L-スレオニン要求性を示し、細胞内のシスタチオニナーシンテース活性及びアスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼII活性が増強された微生物を培地に培養し、培地中にL-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することにより、L-メチオニンを製造する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【住所又は居所】 東京都中央区京橋1丁目15番1号

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100089244

【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ  
ビル6階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ  
ビル6階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ  
ビル6階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】 川口 嘉之

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0000000066]

1. 変更年月日	1991年 7月 2日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名	味の素株式会社